

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Marburg

SPURENKUNDLICHE IDENTIFIZIERUNG VON
FETALEM HÄMOGLOBIN MIT HILFE DER CELLULOSE-
ACETAT-FOLIEN (CAF) - ELEKTROPHORESE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

RAINER WILKENS

aus Celle

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Marburg

SPURENKUNDLICHE IDENTIFIZIERUNG VON
FETALEM HÄMOGLOBIN MIT HILFE DER CELLULOSE-
ACETAT-FOLIEN (CAF) - ELEKTROPHORESE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

RAINER WILKENS

aus Celle

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 17. Dezember 1976
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. I. Oepen
Correferent: Prof. Dr. F. Schleyer

Meiner lieben Frau gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552328_0083

Inhalt

Seite

A. Einleitung

Bisher vorliegende Ergebnisse

1. Grundlagen	1
2. Die CAF-Folie	3
3. Technik des Hb-Nachweises an Blutspuren (Literatur)	4
4. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	6

B. Eigene Versuche

I. Anlegen der Blutspuren, ihre Lagerung und Aufbereitung

1. Material	7
2. Anlegen der Blutspuren	7
3. Lagerung	8
4. Aufbereitung	9

II. Methodik, Vorversuche und Variation der Versuchsbedingungen

1. Methodik	11
2. Vorversuche	14
3. Variation	20
4. Optimale Methodik	21

III. Untersuchung der Blutspuren und Befunde

1. Untersuchung der Blutspuren	
verschiedenen Alters	25
2. Befunde	26
C. <u>Besprechung</u>	31
D. <u>Zusammenfassung</u>	34
E. <u>Literatur</u>	35

A. Einleitung

1. Grundlagen

Eine Unterscheidung von Neugeborenen- und Erwachsenenblut kann in ungeklärten Fällen von Kindstötung von Bedeutung sein. Die Bestimmung von Blutgruppen und Serumeigenschaften genügt hier zur Identifizierung in der Regel nicht, zumal Mutter und Kind oft in vielen Merkmalen übereinstimmen. Die unterschiedliche Ausprägung des Hämoglobins (Hb) bei Neugeborenen und Erwachsenen ermöglicht dagegen eine Differenzierung, obwohl Neugeborenenblut außer fetalem Hämoglobin (HbF) zu etwa 20 % auch Erwachsenenhämoglobin (HbA) enthält.

Gegenwärtig existieren mehrere Methoden, Neugeborenen- oder Fetalblut von Erwachsenenblut zu unterscheiden (Übersicht bei SCHLEYER). Geeignet dafür sind sowohl Merkmale des Erythrocyten (z.B. Hb) als auch des Serums (z.B. α_1 -Fetoprotein).

RAUSCHKE hat als erster die besondere Beschaffenheit des Neugeborenenhämoglobins und zwar seine Alkaliresistenz für die forensische Serologie genutzt. Diese photometrische Methode versagt jedoch bereits bei einem Spurenalter von vier Wochen. Die von KOHN eingeführte CAF-Elektrophorese gestattet

dagegen den Nachweis von HbF für einen längeren Zeitraum. Sie eignet sich außerdem für die Trennung von Serumproteinen sowie von Insulin, Fibrinogen, Histonkörpern und Lysozymen (BERG, KOHN, MULLAND, NELSON, ORIOI-BOSCH).

2. Die CAF-Folie

Für die Trennung von polaren Substanzen (z.B. Eiweißen) kommen verschiedene Elektrophorese-Techniken infrage, die sich hinsichtlich des Trägermaterials, des pH-Wertes der Puffer und der angelegten Stromspannung unterscheiden. Das Trägermedium kann für eine saubere Trennung entscheidend sein (ORIOL-BOSCH, VOIGT). Die Cellulose-Acetat-Folie (CAF) ist ein mikroporöses Schaumsystem im Gegensatz zum Filterpapier, das aus verfilzten Fasern besteht (KOHN). Diese Struktur verleiht der Folie gegenüber dem bei der Papierelektrophorese verwendeten Filterpapier ein anderes Verhalten in Bezug auf Adsorption, Trennschärfe und Wanderungsgeschwindigkeit (SÜDHOF, WALTER).

Neben einer guten Darstellung hat die Folie vor anderen Medien den besonderen Vorzug, daß die Trennung sehr wenig Zeit benötigt, sodaß bei geringem Zeitaufwand das Ergebnis schnell zur Verfügung steht. Ferner kann die Folie im Gegensatz zu einem Gel ohne weitere Präparation nach der Färbung zur Dokumentation aufbewahrt werden.

3. Technik des Hb-Nachweises an Blutspuren (Literatur)

In einer 1969 erschienenen Arbeit berichtet KOHN von einer Auftrennung menschlicher Hämoglobinvarianten mit der CAF-Elektrophoresetechnik. In Anlehnung an diese Arbeit konnte sein Landsmann WRAXALL 1972 zeigen, daß fetales Hämoglobin auch in Blutspuren (auf Stoffproben ab einer Größe von 2,5 x 1 mm) bis zu einer Alterung von drei Monaten nachzuweisen war. Hierzu verwendete WRAXALL den von KOHN angegebenen Puffer (s. B.II.1):

Anodenpuffer: Tris/EDTA/Borsäure-Puffer

Kathodenpuffer: Barbiturat-Puffer.

Die Elektrophoresekammer war eigens für die CAF-Elektrophoresetechnik von der Shandon Scientific Company LTD. entwickelt worden.

Die Elektrophoresedauer betrug 60 Minuten bei 160 Volt (keine nähere Angabe) und bei Zimmertemperatur. Anschließend wurden die Folien fünf Minuten in einer Lösung von Ponceau S (0,15 % in 3 % Trichloressigsäure) gefärbt und in einer 5 %igen Essigsäure in vier Arbeitsgängen zu je fünf Minuten entfärbt. Angaben über Zeitdauer der Färbung und Entfärbung wurden aus einer 1964 erschienenen Arbeit von KOHN übernommen.

WRAXALL berichtete über folgende Ergebnisse mit dieser Methode:

1. Er erhielt eindeutige Ergebnisse hinsichtlich der Trennung von HbA und HbF sowie von HbS und HbC.
2. Die Identifizierung von fetalem Hämoglobin in Blutspuren war bis zu drei Monaten möglich.
3. Angaben über die Untersuchung älterer Blutspuren und deren Ergebnisse fehlen.

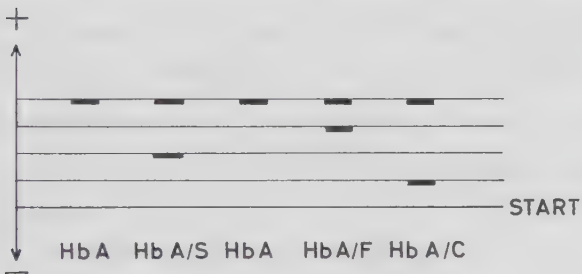


Abb. 1 Auftrennung von Hb-Varianten jeweils mit HbA gemischt, schematisch nach WRAXALL.

4. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die von den englischen Autoren angegebenen Daten sollten auf ihre Reproduzierbarkeit geprüft werden. Die ausstehenden Befunde über den Einfluß verschiedener Spureträger (Holz, Glas, Filterpapier, Stoff) auf den Nachweis von fetalem Hämoglobin aus Blutspuren sollten ergänzt werden, ebenso wie die zeitliche Grenze der Nachweisbarkeit bei gealterten Blutspuren.

Vorher mußte die Technik auf die von der Fa. Biotest, Frankfurt/M., *) entwickelte Kammer umgestellt werden.

*) Ich danke der Fa. Biotest, Frankfurt/Main für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

B. Eigene Versuche

I. Anlegen der Blutspuren, ihre Lagerung und Aufbereitung

1. Material

Für die Untersuchungen wurde frisches Nabel-
venenblut aus den gynäkologischen Abteilungen der
Universitäts-Frauenklinik, Marburg, des Stadt-
und Kreiskrankenhauses in Wetzlar, des Kaiserin-
Auguste-Victoria-Krankenhauses in Ehringshausen
sowie des Diakoniekrankenhauses, Wehrda/Marburg,
verwendet.

Das zur Kontrolle dienende Erwachsenenblut
wurde von Spendern der Blutbank, Marburg, gewon-
nen. *)

2. Anlegen der Blutspuren

Durch Citratzusatz ungerinnbar gemachtes
frisches Nabelvenen- und genauso präpariertes

*) Den Abteilungsleitern der oben genannten Klini-
ken, dem Leiter der Marburger Blutbank und vor
allem deren Mitarbeitern danke ich für die Be-
reitstellung der Blutproben.

Erwachsenenkontrollblut wurde auf verschiedene Trägermaterialien aufgetropft. Diese waren ungefähr gleich große, zuvor zurecht geschnittene Spureenträger, nämlich Furnierholz, Fensterglas, weißer Leinenstoff sowie Filterpapier Nr. 2043 b (Schleicher u. Schüll). Auf einer 5 cm x 2,5 cm großen Unterlage konnte nun gut etwa 1 ml des Nabelvenen- oder Erwachsenenblutes aufgebracht werden. Am zweckmäßigsten erwies es sich, die so angelegten Spuren über Nacht bei Zimmertemperatur zum Trocknen liegen zu lassen. Es stellte sich heraus, daß die Spuren auf Papier und Stoff am schnellsten antrockneten und die größte Spurenfläche bildeten.

3. Lagerung der Blutspuren

Das erfreulicherweise große Angebot an Blutproben, sowie deren Datierung gestattete eine Erfassung der Blutspuren in kontinuierlicher Folge. Hierdurch war es möglich, einen Plan für die Blutspuren aufzustellen, aus dem sich jederzeit das genaue Alter ablesen ließ und der somit ein lückenloses und fehlerfreies Aufarbeiten der künstlich angelegten Blutspuren garantierte.

Die so präparierten Blutspuren wurden nach dem Alter geordnet, nummeriert und in vorbereitete Schubladen zur Alterung gelegt. Die auf Glas ange-

legten Spuren mußten besonders behutsam behandelt werden, da sich der Blutstaub leicht löste. Zur Verhinderung von Spurenübertragungen wurde sauberes Papier zwischen die einzelnen Leinenlappchen sowie zwischen Holz und Papier gelegt. So konnte eine große Zahl von Blutspuren dank der gewählten Spureenträger sowie deren Größe auf kleinem Raum gelagert werden. Die Temperaturschwankungen im Labor bewegten sich entsprechend der Jahreszeit während der Lagerung zwischen 20 und 30 ° C.

4. Aufbereitung der Spuren

Die Spurenaufbereitung von den Trägern Holz und Glas machte keine Schwierigkeiten. Jeweils die ganze angetrocknete Blutspur wurde sorgfältig von dem entsprechenden Spureenträger gelöst. Von der Glas- und Holzfläche wurde das angetrocknete Blut mit einem Metallspatel abgekratzt und in fünf Tropfen = 0,25 ml Aqua destillata in einem Zentrifugenröhrchen gelöst.

Das vom Blut durchtränkte Stoff- oder Filterpapierstück wurde ausgeschnitten und in kleine Stückchen und Fasern zerkleinert. Anschließend wurde ebenfalls 0,25 ml Aqua destillata hinzugegeben, damit betrug die Konzentration der Spuren-

lösung das 4-fache des Frischblutes (Ausgangsmenge 1 ml).

Während die Blutfleckenlösung vom Glas und Holz nur etwas geschüttelt und dann stehen gelassen wurde, mußten die Stoff- und Filterpapierstückchen intensiver und länger behandelt werden. Jedes Röhrchen wurde mehrfach in Abständen von 30 Minuten geschüttelt und die Inhalte mit einem Glasstab aufgerührt. Nach etwa sechs Stunden wurden die Stoff- und Filterpapierstückchen noch einmal kräftig ausgepreßt und die Überstände abpipetiert. Die somit gewonnene Menge reichte für einen Tüpfel in der Zonenelektrophorese aus.

II. Methodik, Vorversuche und Variation der Versuchsbedingungen

1. Methodik

a) Aufbereitung der Spuren:

Wie schon unter B.I.4 ausgeführt, wurden die künstlich angelegten Spuren in fünf Tropfen entsprechend 0,25 ml Aqua destillata gelöst. Man erhielt eine so hämolysierte Blutlösung, die 4-fach konzentrierter als das Frischblut war. Lösungen, die nicht am selben Tag verarbeitet werden konnten, wurden über Nacht bei -20°C eingefroren, um einer nicht erwünschten Alterung vorzubeugen. Sie wurden später bei Bedarf aufgetaut.

b) Für die Elektrophorese wurde der von KOHN und WRAXALL angegebene Puffer verwendet.

An der Anode: 0,26 m Tris-Puffer - pH 9,1

25,2 g Tris $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (Merck 8382)

2,5 g EDTA $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 8421)

1,9 g Borsäure H_3BO_3 (Merck 160)

ad 1000 ml

An der Kathode: Barbiturat-Puffer - pH 8,6

5,15 g Barbitat-Natrium $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{NaO}_3$

(Merck 500538)

0,92 g Diäthylbarbitursäure $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$

(Merck 500535) ad 1000 ml

c) Die Elektrophoreseausrüstung (27,5 x 20,5 cm) war von der Fa. Biotest, Frankfurt/M., zunächst für den Nachweis der erythrocytären Isoenzyme Adenosindesaminase (ADA), Adenylatkinase (AK), Phosphoglucomutase (PGM) und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6-PGD) auf CAF-Folien entwickelt worden (Abb. 2).

d) Die Zeitdauer für einen Elektrophoreselauf beträgt bei Zimmertemperatur und bei einem Spannungsgradienten von 16 V/cm 90 Minuten.

e) Für die elektrophoretische Trennung wurden Cellulose-Acetat-Folien (7,5 x 15 cm) der Firma Biotest aus Frankfurt/M., verwendet.

f) Die hämolysierten Blutproben und die gelösten Blutspuren wurden mit Hilfe eines Auftragesystems auf die Folien aufgetragen. Das von SONNEBORN u. Mitarb. entwickelte System besteht aus Auftrageschablone und Auftragekamm. Die Verwendung von Schablone und Kamm gestattet ein exaktes Aufbringen von je acht Proben einer definierten Menge Hämolysats pro Folie. Für die Beschickung der Schablonen mit der Blutlösung wurde eine Eppendorf-Pipette (10 μ) verwendet. (Auftragesystem siehe Abb. 2).

g) Für die Stromversorgung stand ein Gleichstrom-Netzgerät der Fa. Vogel, Gießen, mit der Typen-

bezeichnung DC 600 V zur Verfügung.

h) Die von WRAXALL angegebene Färbung der Folien mit Ponceau S (0,15 % in 3 % Trichloressigsäure) wurde beibehalten.

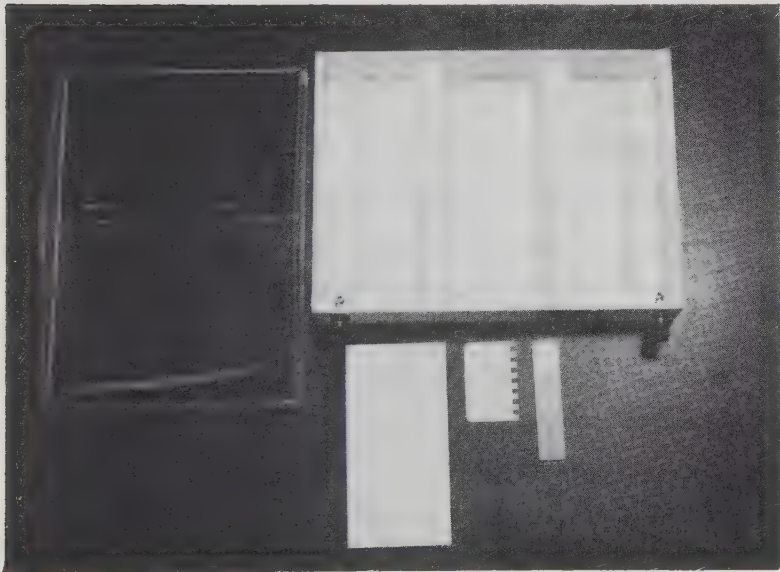


Abb. 2 Elektrophoresekammer und Auftragesystem der Fa. Biotest.

2. Vorversuche

Bei den eigenen Vorversuchen mit Hämolysaten wurden zunächst die von WRAXALL angegebenen Daten über Laufzeit der Elektrophorese und angelegte Spannung übernommen, ebenso diejenigen über Pufferzusammensetzung und Anfärbung der Folien mit Ponceau S. (siehe S. 4, Punkt 3). Ausgangsmaterial für die Vorversuche waren durch Citratzusatz ungerinnbar gemachtes Nabelvenenblut (siehe S. 7, Punkt 1) und Nativblutproben aus der Blutbank Marburg. Sämtliche Blutproben waren nicht älter als 10 Tage.

2.1. Herstellen der Hämolysate

- a) 0,5 ml Nabelvenen- oder Erwachsenenblut wurde in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert.
- b) Das Blut wurde mit 5 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt und dann
- c) 2 - 3 Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert.
- d) Die überstehende klare Flüssigkeit wurde abpipettiert und das Sediment, wie unter b und c beschrieben, erneut behandelt. Der Waschvorgang wurde insgesamt 3 mal vorgenommen.
- e) Zum Schluß wurde zum Erythrocytenkonzentrat eine Menge von 0,5 ml Aqua bidest. hinzugegeben.
- f) Die Zentrifugenröhrchen wurden dann über Nacht bei -20°C eingefroren.

2.2. Präparation der Folien

- a) Zur Beschriftung der Folie: ist säure- und alkaliresistente Tinte notwendig, die sich im Puffergemisch nicht löst. Bei den eigenen Versuchen wurde ein Kugelschreiber verwendet, nachdem sich das Beschriften mit dem Bleistift (hebt sich auf dem Untergrund nicht genügend ab) oder mit einem dünnen Filzschreiber (löst sich im Puffergemisch) als ungeeignet erwiesen hatte.

b) Tränken der Acetatfolie in Pufferlösung:

Hierzu mußte zunächst ein Gemisch aus den Puffern für den anodischen und kathodischen Teil der Kammer hergestellt werden (s.B.II.1) In ein Plexiglasschälchen wurden erst 50 ml des anodischen Tris-Puffers gegeben und dann weitere 50 ml des kathodischen Barbiturat-Puffers hinzugefügt. Sodann wurde die Folie an einer Seite mit einer Deckglaspinzette gefaßt und mit dem freien Ende vorsichtig in das Puffergemisch getaucht. Nach und nach mußte dann die gesamte Folie flach auf die Flüssigkeit gelegt werden. Durch kapillaren Sog wird sie von unten benetzt. Nach vollständiger Durchtränkung muß der CAF-Streifen zusätzlich mit der Pinzette in die Lösung eingetaucht werden.

c) Trocknen der Acetatfolie:

Nach 15 Minuten wurden die Folien dem Puffergemisch wieder entnommen und überschüssiger Puffer behutsam zwischen zwei Filterblättern abgestrichen. Ein zu starkes Trocknen mußte vermieden werden.

d) Einlegen der Folie in die Elektrophoresekammer:

Die Folie mußte in der Weise auf die Trägerbrücke aufgelegt werden, daß die beiden freien Membranenden mit gleicher Länge in die Puffer eintauchten. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß die Folien glatt und ohne Luftblasen auf der Auflage hafteten. Ohne Verzögerung mußte die Kammer mit dem Deckel verschlossen werden, um ein Austrocknen der Folie zu vermeiden.

2.3. Impftechnik bei Hämolysaten:

Zum Auftragen des Hämolysates wurde das von SONNEBORN u. Mitarb. entwickelte Auftragesystem verwendet. Die Auftrageschablone dieses Systems ist aus durchsichtigem Kunststoff 9 cm lang und 2 cm breit. Die acht kreisförmigen Vertiefungen für die Aufnahme der Untersuchungsproben sind in der Mitte der Schablone angeordnet und weisen von der Mitte der einen Vertiefung bis zur Mitte der näch-

sten einen Abstand von 8 mm auf. Der Kamm besteht aus einem 6 cm langen Kunststoffbügel, an dessen unteren Ende acht 4 mm breite Zacken in ebenfalls 4 mm weiten Abständen angeordnet sind. Die Zacken selbst sind an ihrem Ende abgeflacht, sodaß die aufzutragende Menge der Blutlösung variiert werden kann: mit der Zackenkante wird weniger Spurenmaterial übertragen, als mit dem abgeflachten Teil der Zacke. Schablone und Kamm waren wegen der ausreichenden Tüpfelabstände so konstruiert, daß ein sauberes Aufnehmen der Untersuchungsproben von der Schablone mit dem Kamm gewährleistet war.

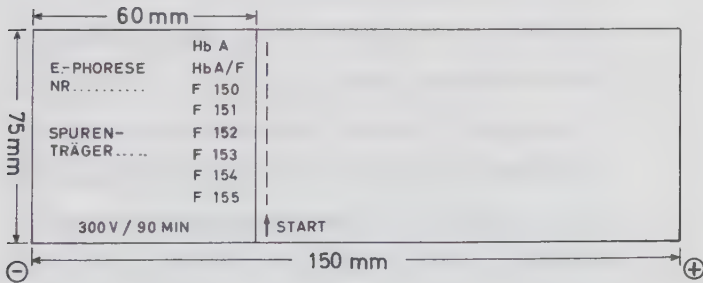


Abb. 3 Modell einer beschickten Acetat-Folie

2.4. Vorbereitung der Elektrophoresekammer:

Die nach WRAXALL angesetzten Puffer wurden in den Behälter B und C der Kammer (Abb.2) eingefüllt und zwar 250 ml in den anodischen Teil und 250 ml in den kathodischen Teil der Kammer. Die Elektrophorese wurde mit einer angelegten Spannung von 160 V am Gerät ($= 16 \text{ V/cm}$) und einer Laufzeit von 60 Min. vorgenommen.

2.5. Anfärbung der Elektrophoresestreifen:

Es wurde eine 0,15 %ige Lösung von Ponceau S in 3 %iger Trichloressigsäure benutzt. Unmittelbar nach der elektrophoretischen Trennung wurde der Streifen zwischen zwei Filterpapierblättern von überschüssigem Puffer befreit und dann auf die Oberfläche des Farbbades gelegt, sodaß die Farbstofflösung eindringen konnte. Um eine homogene Anfärbung des Streifens zu erreichen, wurde er mittels einer Deckglaspinzette in die Farbstofflösung getaucht. Die Dauer der Anfärbung betrug fünf Minuten, längere Anfärbezeiten konnten keine Fehler verursachen.

2.6. Entfärbung der gefärbten Elektrophoresestreifen:

Bei der Färbung mit Ponceau S erfolgt die Entfärbung in wenigen Minuten und macht

keinerlei Schwierigkeiten. Der Untergrund wird praktisch farblos. Es war notwendig, das Entfärbebad zwei - bis dreimal zu wechseln, das letzte Bad sollte fast farblos sein. Dabei war die Dauer der Entfärbung von geringer Bedeutung, man konnte die Streifen sogar über Nacht im Entfärbebad belassen. Die entwickelte Methodik, die Folien mit vier Entfärbebädern zu je fünf Minuten zu behandeln, erwies sich zum Schluß als die zweckmäßigste.

2.7. Transparentmachen der Streifen:

Ogleich das Ziel der Arbeit der qualitative Nachweis von fetalem Hämoglobin in Spuren mit der CAF-Technik war, wurde die Möglichkeit, die Streifen transparent zu machen, für eine eventuelle spätere quantitative Auswertung mit der Densitometrie versucht. Hierzu wurde Paraffinöl (Merck) in ein Schälchen gegeben und die entfärbten Folien mit der Pinzette mehrmals durch dieses Paraffinbad gezogen. Das Ergebnis war eine glasklare Transparenz. Die so behandelten Folien konnten zwischen zwei Glasplatten aufgehoben werden.

2.8. Ergebnisse der ersten Vorversuche:

Infolge mangelnder Erfahrung und unbekannter Fehlerquellen ergaben sich zunächst nicht auswertbare Resultate.

- a) Die Hb.-Zonen, die anodenwärts wandern müssen, blieben in Startnähe liegen. Eine Differenzierung zwischen den HbF-Zonen und denen des als Kontrolle dienenden HbA war deshalb nicht möglich.
- b) Außerdem wanderte das Hb nicht, wie WRAXALL und KOHN beschrieben hatten, band- oder punktförmig, sondern zungenförmig und schmierte mit einem mehr oder weniger breiten Schwanz von der Auftragestelle weg.

3. Variation der Versuchsbedingungen

Nach mehreren ergebnislosen Bemühungen wurde versucht, durch Änderung der Färbemethode zum Ziele zu kommen. Ponceau S wurde durch eine speziell für das Anfärben von Hämoglobinen bewährte Toloidinlösung ersetzt.

Toloidinlösung zum Hämoglobinnachweis:

- 1 gr. Toloidin
- 50 ml Essigsäure
- 50 ml Aqua dest.
- 1 ml Perhydrol

Das Gemisch wurde unter Zusatz von etwas heißem Wasser gelöst.

Dieser Versuch führte aber nicht zu den erhofften

Verbesserungen der bisherigen Ergebnisse. Kurz nach Einbringen der Folie in das Toloidinbad, löste sie sich auf. Weitere Versuche mit verdünnter Toloidinlösung wurden nicht unternommen. Da später gute reproduzierbare Ergebnisse mit Ponceau S erzielt wurden, wurde diese Färbung beibehalten.

Der Versuch, die Spannung am Gerät und die Laufzeit zu erhöhen, führte zu ersten ablesbaren Ergebnissen. Optimale Werte ergaben sich bei Spannungen von 300 V am Gerät (≈ 30 V/cm) und einer konstanten Stromstärke von 11 mA. Die Laufzeit wurde von 60 Minuten (WRAXALL) auf 90 Minuten erhöht. Erst diese Bedingungen führten zu Elektrophoresebildern, wie sie WRAXALL in seiner Arbeit veröffentlicht hatte (Abb. 1).

4. Optimale Methodik

4.1. Vorbereitung am Vortage:

- a) Ansetzen der Puffer für den anodischen und den kathodischen Teil der Elektrophoresekammer (s.B. II.1)
- b) Hämolysatherstellung (s.B.II.2)
- c) Bei Spurenuntersuchungen verfahren wie unter B.I.4 angegeben.

4.2. Einfüllen des Puffers in die Elektro- phoresekammer

Jeweils 250 ml Puffer in den anodischen und kathodischen Teil der Kammer einfüllen. Dabei wird der 0,26 m Tris-Puffer in den anodischen Pufferbehälter, der Barbiturat-Puffer in den kathodischen gebracht.

Abb. 4a



4.3. Tränken der Acetat-Folie in Pufferlösung

Je 50 ml der unter 4.2 angegebenen Puffer werden in eine Schale gegeben. In dieses Puffergemisch werden die Folien vor der Elektrophorese für 15 Minuten eingelegt. (Zu schnelles Eintauchen führt zu Lufteinschlüssen im Trägermedium !)

Abb. 4b



4.4. Zum Trocknen der Folie wird sie mit einer Deckglaspinzette aus dem Pufferbad herausgenommen und zwischen zwei Filterpapieren gelegt. Der überschüssige Puffer wird durch leichtes Darüberstreichen entfernt.

4.5. Folien in die Elektrophoresekammer einlegen

Man muß darauf achten, daß die Folien glatt und ohne Luftblasen auf der Auflage haften. Ein Durchhängen der Folien oder deren Berührung mit den Seitenwänden der Kammer muß unbedingt vermieden werden.

Abb. 4c



4.6. Anschließend die Kammer mit dem Deckel verschließen. Die Folie darf auf keinen Fall austrocknen !

4.7. Die Proben werden mit einer Eppendorf-Pipette (10μ) auf die Schablone getropft.

Abb. 4d



4.8. Der Kammerdeckel wird abgenommen und die Proben werden mit dem Auftrageskamm von der Schablone auf die Folie übertragen. Die Auftragestelle soll 1 cm von der Auflage der Folie entfernt sein. Ein zügiges Arbeiten ist hierbei notwendig, da die Folien bei abgenommenem Deckel leicht austrocknen.

4.9. Die Kammer wird wieder verschlossen und der

Strom eingeschaltet !

- 4.10. Nach 20 Minuten muß die Spannung kontrolliert werden, Spannungsbefälle am Gerät von 10-20 Volt sind möglich, dann soll auf den Ausgangswert neu eingestellt werden.
- 4.11. Färben: 5 Minuten in Ponceau S (0,15 %ig in 3 %iger Trichloressigsäure).
- 4.12. Entfärben: 20 Minuten in 5 %iger Essigsäure.
Dazu werden vier Entfärbebäder verwendet, in die die Folien für je fünf Min. eingebracht werden. Das letzte Bad sollte farblos sein.
- 4.13. Die Folien können - bei Zimmertemperatur getrocknet - zur Dokumentation aufgehoben werden.
- 4.14. Will man später nochmals ablesen, muß die Folie wieder mit Wasser angefeuchtet werden. Die Hämoglobinbanden werden dann wieder so deutlich wie ursprünglich.

III. Untersuchung der Blutspuren und Befunde

1. Untersuchung der Blutspuren verschiedenen Alters

Ausgangsmaterial für die eigenen Versuche waren 160 Nabelvenenblutproben und Kontrollblute von Erwachsenen.

a) Aufstellung eines Alterungsplanes

Durch das große Angebot an Blutproben aus vier Kliniken (manche Proben waren sogar doppelt oder dreifach vorhanden), sowie deren Datierung, war eine genaue Erfassung der Proben über einen Zeitraum von sechs Monaten (Dezember 1974 - Mai 1975) möglich. Die Blutröhrchen wurden kontinuierlich von 1 - 160 durchnummeriert, sodaß die niedrigen Zahlen die älteren und die hohen Zahlen die jüngeren Blutproben bezeichneten.

b) Anlegen der künstlich erzeugten Blutspuren

Sowohl die durch Citratzusatz ungerinnbar gemachten Nabelvenenblutproben, als auch die als Kontrolle dienenden Proben von Erwachsenen wurden auf verschiedene Spureenträger (Holz, Glas, Papier und Stoff) getropft (s.B.I.2), über Nacht bei Zimmertemperatur getrocknet, nach dem unter a beschriebenen Plan gekennzeichnet und dann in Schubladen zur Alterung bei Zimmertemperatur gelegt.

c) Die Aufbereitung der Spuren wurde entsprechend der Beschreibung unter B.I.4 vorgenommen.

d) Untersuchung der gealterten Spuren

Die Untersuchungen wurden zunächst an frischen Spuren vorgenommen. Das waren die Spuren mit der Zahlenkennzeichnung 150-160. Die Abbildung 5 gibt das bei den Untersuchungen verwendete Protokoll wieder. Daraus ist ersichtlich, daß jeweils sechs Spuren pro Folie untersucht wurden. Auf den Positionen 6 und 8 wurden zur Kontrolle ein Hämolysat von Erwachsenenblut sowie ein Gemisch aus Neugeborenen- und Erwachsenenblut aufgetragen. Hierbei wurden die Spuren von verschiedenen Trägern meistens in der Reihenfolge Holz, Glas, Papier und Stoff untersucht.

2. Befunde

Ein Nachweis von HbF aus 640 künstlich angelegten Nabelvenenblutspuren gelang bei 380 Proben. Dabei sind die Spurennachweise von den vier geträgerten Spureenträgern, nämlich Holz, Glas, Papier und Stoff mit gleichen Anteilen vertreten; oder anders ausgedrückt: die Spuren waren unabhängig vom Spureenträger in 95 Fällen nachzuweisen, (bei je 4 Spureenträger = 380 Proben). Das Alter dieser Spuren betrug gut drei Monate. Es muß hinzugefügt werden, daß etwas

Über drei Monate alte Spuren nur dann noch sicher beurteilt werden können, wenn entsprechende Erfahrung vorliegt. Noch ältere Spuren waren aber stets negativ, d.h. die Neugeborenenproben wanderten nun schneller und unterschieden sich nicht mehr vom Erwachsenenhämoglobin.

Der Einfluß von Spureenträgern wirkte sich nicht störend aus. Eine unbedeutende Abweichung der Wanderungsgeschwindigkeit mit etwas längerer Laufstrecke wurde nur bei Spuren beobachtet, die auf Glas getrocknet waren. Das beruht vermutlich auf der besseren Löslichkeit dieser Spuren.

ROHR NR.	LAUF NR.	MAT.	DATUM	ALTER	ER- GEBNIS	BEMERKUNG
160	1	HOLZ	27.05.75	1.Tg.	++	VERDÜNNUNG 4 + 1
159	2	HOLZ	26.05.75	2.Tg.	++	"
158	3	HOLZ	25.05.75	3.Tg.	++	"
157	4	HOLZ	24.05.75	4.Tg.	++	"
	5					
Hb A/F	6	HÄMO- GLOBIN GEM.			+ -	GEMISCH 1 : 1
	7					
Hb A	8				-	"

+ = schwach positiv

++ = stark positiv

- = negativ

Abb. 5 Protokoll mit Fetalblutproben (Nr. 157-160)

und Kontrollen (HbA/HbF-Gemisch).

Erläuterungen s.B.II.1.

Abb. 6 zeigt die deutlich langsamere Wanderung von HbF gegenüber HbA.

Hb A

Hb A/F

137

138

139

140

-

+

Abb. 6 CAF-Folie mit Fetalblutproben (Nr. 137-140) und Kontrollen (HbA und HbA/HbF-Gemisch), gefärbt und entwässert.

Es konnte auch die Blutprobe einer Patientin mit

der Hb-Variante HbS untersucht werden. Sie zeigte das von URAXALL beschriebene Verhalten. Da die Patientin an einer Virus-Hepatitis litt, wurde die Blutprobe und die Folie wegen der Infektionsgefahr sofort nach der Analyse vernichtet und daher nicht fotografiert.

C. Besprechung

In manchen Fällen von Kindestötung oder bei Verdacht auf illegalen Abort kann es von großer Bedeutung sein, gefundene Blutspuren auf ihre Herkunft zu analysieren. Für die Unterscheidung von Neugeborenen- und Erwachsenenblut sind sowohl Eigenschaften des Erythrocyten selbst als auch Serum-eigenschaften, wie später noch erwähnt wird, geeignet. Eine Besonderheit der fetalen Erythrocyten ist ihr Gehalt an fetalem Hämoglobin (HbF). Er beträgt bei der Geburt 50-85 %, nimmt dann ab und macht vier Monate später nur noch 10 % des Gesamthämoglobins aus.

Da das fetale Hämoglobin gegenüber Laugen und Säuren resistenter ist als Erwachsenen-hämoglobin, kann man diese beiden Hämoglobinarten an frischem Blut mit der Alkali-Denaturierungsmethode oder der Säureelutionstechnik unterscheiden. Die Differenzierung ist für klinische Fragen von praktischer Bedeutung, z.B. wenn bei Blutung aus dem Magen-Darm-Trakt Neugeborener festgestellt werden soll, ob es sich um verschlucktes mütterliches Blut handelt; oder wenn durch Untersuchung des mütterlichen Blutes ein feto-maternaler Blutübertritt vermutet wird (HARNACK). In der spurenkundlichen Analyse erbrachte diese Technik, wie von RAUSCHKE u.A. beschrieben, nur unbefriedigende

Ergebnisse. Der Nachteil dieser Methode war, daß eine sehr große Blutspurenmenge benötigt wurde, und daß der Nachweis schon nach vier Wochen nicht mehr gelang. Eine weitere Möglichkeit der spurenkundlichen Unterscheidung von HbF und HbA besteht in der sehr kostspieligen und aufwendigen Immunelektrophorese mittels Präzipitation durch Anti-HbF-Immunsereen, die von TAMACHI, von BAXTER und REES beschrieben wurde.

Für die Routine tragbar war erst das von WRAXALL veröffentlichte und in der vorliegenden Studie nachgearbeitete Verfahren. Neben dem geringeren Kostenaufwand hat die Methode gegenüber den früheren Verfahren den Vorteil, mit kleineren Spuren Mengen (Stoffproben von 1 x 2,5 mm Größe) in kürzerer Zeit und an gealterten Blutspuren bis zu 3 Monaten noch gute Resultate zu ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit einem für diesen Zweck noch nicht erprobten Elektrophoresesystem die Methode und die Ergebnisse WRAXALLS nachgeprüft. Dazu mußten die technischen Angaben und Versuchsbedingungen auf dieses Elektrophoresesystem umgestellt werden. Außerdem sollte die Grenze der Lagerungszeit ermittelt werden, nach der an den künstlich angelegten Blutspuren auf verschiedenen Trägermaterialien das HbF noch sicher bestimmt werden

konnte. Die von WRAXALL gefundenen Ergebnisse wurden bestätigt: in der eigenen Untersuchung gelang der Nachweis des fetalen Hämoglobins in allen künstlich angelegten Blutspuren, vom 1.-95. Tag einwandfrei. Mit dieser Methode steht somit der spurenkundlichen Analyse ein sicheres Verfahren zum Nachweis von fetalem Hämoglobin zur Verfügung.

Eine weitere Möglichkeit, Neugeborenen- von Erwachsenenblut zu unterscheiden, besteht in der Bestimmung von α_1 -Fetoprotein. Sie wurde von STAFUNSKY zur gleichen Zeit am gleichen Spurenmaterial vorgenommen und gelang noch nach 8-monatiger Lagerungszeit.

D. Zusammenfassung

Es wurden 160 Nabelvenenblutproben verschiedenen Alters mit Hilfe der Zonenelektrophorese auf Cellulose-Acetat-Folien untersucht. Die von WRAXALL angegebene Technik zur Unterscheidung von fetalem (HbF) und Erwachsenen-Hämoglobin (HbA) wurde modifiziert, sodaß eine in der Bundesrepublik Deutschland erhältliche Elektrophoreseausrüstung der Fa. Biotest verwendet werden konnte. Mit dieser Technik konnte Neugeborenenblut bis zu gut 3 Monaten richtig diagnostiziert werden. Die untersuchten Spurenräger Holz, Glas, Filterpapier und Stoff hatten keinen störenden Einfluß auf die Darstellung. Die Methode ist zuverlässig und nicht aufwendig, sodaß sie für Routine-Untersuchungen in der forensischen Serologie sehr gut geeignet ist. Da auch andere Varianten des Erwachsenen-Hämoglobins wie HbS und HbC mit dieser Technik erfaßt werden, kommt die Methode auch für klinische Screening-Tests in Frage.

E. Literatur

BAXTER, S.J. and REES, B.: The use of antihuman
hämoglobin in forensic serology. Med. Sci. Law 14,
159-162 (1974)

BAXTER, S.J. and REES, B.: The immunological
identification of foetal haemoglobin in blood-
stains in infanticide and associated crimes.
Med. Sci. Law 14, 163-167 (1974)

HARNACK, von G.: Kinderheilkunde, 3. Auflage,
Berlin (Springer) 1974

KOHN, J.: Zur Technik der Cellulose-Acetat-Elektro-
phorese, Arztl. Lab. 10, 233-248 (1964)

KOHN, J.: Separation of hæmoglobins on cellulose
acetate. J. Clin. Path. 22, 109 (1969)

KOHN, J.: A cellulose acetate supporting medium
for zone electrophoresis. Clin. Chim. Acta 2, 297-
303 (1957)

MULLAND, F.A., HANCOCK, D.M.: and NEILL, D.W.:
Elektrophoresis of serum and soluble liver proteins
on cellulose acetate. Nature 14, 149-150 (1962)

NELSON, Th., GARLAND STROUP, M.D. and WEDELL, B.S.:
Immunoelktrophoretic identification of human serum
proteins on a cellulose-acetate medium.
Amer. J. Clin. Path. 42, 237-244 (1964)

ORIOL-BOSCH, A. und VOIGT, D.: Über die Anwendung
einer Cellulose-Acetat-Folie für die Eiweißelektro-
phorese. Klin. Wschr. 37, 758 (1964)

RAUSCHKE, J.: Zur Unterscheidung des kindlichen
vom Blut Erwachsener. Z. gerichtl. Med. 42,44 (1953)

SCHLEYER, F.: Leitfaden der gerichtlich-medizini-
schen Blutspuren - Untersuchung. (Lübeck) Schmidt-
Römhild (1966)

SONNEBORN, H.H. und STINDL, J.: Die Verwendung des
CAF-Elektrophorese-Systems für den Nachweis von
Au/SH-Antigen und -Antikörper sowie α_1 -Feto-
protein, Biotest-Mitteilungen Nr. 29 (1972)

STAFUNSKY, M.: Spurenkundliche Identifizierung von
Neugeborenenblut mittels α_1 -Fetoprotein-Präzi-
pitation. Diss. Marburg (noch nicht veröffentlicht).

SÜDHOF, H. und WALTER, B.: Die immunelektrophoretische Technik auf der Zellulose-Acetat-Folie.
Clin. Chim. Acta 8, 434-439 (1963)

TAMACHI, H.: Immunological determination of human fetal hemoglobin. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 501-505 (1973)

WRAXALL, B.G.D.: The identification of foetal haemoglobin in bloodstains. J. Forensic. Sci. Soc. 12, 457-458 (1972)

Frau Professor Dr. med. I. Depen danke ich für
die Überlassung des Themas, für ihre wertvollen
Anregungen und Hinweise und für ihre Beratung bei
der Abfassung der Dissertation.

Lebenslauf

Am 25. September 1945 wurde ich als drittes Kind des praktischen Arztes Dr. med. Georg Wilkens und dessen Ehefrau Lucia, geb. Gurlitt, in Celle geboren.

Ostern 1952 wurde ich in die Celler Volksschule Maldweg eingeschult und wechselte von dort in das neusprachliche Gymnasium Hermann-Billing, Celle, über, das ich 1962 mit Obertertiareife verließ.

1962 trat ich in Hannover in ein Lehrverhältnis als Hotelkaufmann ein und beendete die Lehre 1965.

Im März dieses Jahres wurde ich zur Bundeswehr einberufen, verpflichtete mich auf zwei Jahre und wurde im April 1967 entlassen.

Ab Mai 1967 besuchte ich das Abendgymnasium für Berufstätige in Gießen und legte am 14. Juli 1970 dort die Reifeprüfung ab.

Seit 1968 bin ich verheiratet. Wir haben einen Sohn.

Nach der Reifeprüfung bemühte ich mich um die Zulassung zum Studium der Medizin, die ich zunächst jedoch nicht erhielt. Im Wintersemester 1970/71 schrieb ich mich daher pro forma für das Studium der Rechtswissenschaft in Gießen ein, bis ich zum Sommersemester 1971 die Zulassung für das Medizinstudium an der Philipps-Universität, Marburg, erhielt.

Hier legte ich am 21.4.1972 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 10.9.1973 die ärztliche Vorprüfung ab.

Am Ende des Sommersemesters 1976 bestand ich die ärztliche Staatsprüfung.

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die
Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Bichler, Buchholz, Büsing, Dimroth, Eißner,
Exner, Friedrich, Ganz, Geus, Golenhofen, Graul,
Haberich, Hamelmann, Hardewig, Hensel, Hering,
Hess, Hildebrandt, Hilgermann, Hort, Huch, Jakob,
Karlson, Klaus, Kleinsasser, Koecke, Koransky,
Linneweh, Mannheim, Maroske, Martini, Oehmig,
Oepen, I., Petry, Pots, Riecken, Rodeck, Rohen,
Schiff, Schleyer, Schmitz-Moormann, Schneider,
Siegert, Straub, Thoenes, Walcher, Wehrmeyer

